

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-109781

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)5月14日

C 12 N 15/00  
C 12 Q 1/68  
// G 01 N 33/53  
33/577

8412-4B  
8412-4B  
D-7906-2G  
7906-2G

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 *recA* 蛋白様蛋白と抗 *recA* 蛋白様蛋白単クローン抗体とを併用した簡便な D ループ生成法

⑯ 特 願 昭61-254993

⑰ 出 願 昭61(1986)10月27日

⑱ 発 明 者 牧 野 修 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内  
⑲ 発 明 者 柴 田 武 彦 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内  
⑳ 出 願 人 理 化 学 研 究 所 埼玉県和光市広沢2番1号  
㉑ 代 理 人 弁 理 士 中 村 稔 外4名

## 明 細 書

1. 発明の名称 *recA* 蛋白様蛋白と抗 *recA* 蛋白様蛋白単クローン抗体とを併用した簡便な D ループ生成法

### 2. 特許請求の範囲

- (1) 閉環状二重鎖 DNA と該二重鎖 DNA と共通の塩基配列を有する単鎖 DNA 断片とを *recA* 蛋白様蛋白と抗 *recA* 蛋白様蛋白単クローン抗体で処理することからなる閉環状二重鎖 DNA に D ループ構造を形成する方法。
- (2) *recA* 蛋白様蛋白が大腸菌 *recA* 蛋白である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。
- (3) *recA* 蛋白様蛋白が T4 フェージ由来の *uvsX* 蛋白、枯草菌由来の *rec* 蛋白又は黒穂菌 (*Ustilago*) 由来の *rec1* 蛋白である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。
- (4) 抗 *recA* 蛋白様蛋白単クローン抗体が ARM 193 である特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は、閉環状二重鎖 DNA に D ループ構造を形成する方法に関する。更に詳しくは *recA* 蛋白様蛋白と抗 *recA* 蛋白様蛋白単クローン抗体とを併用する D ループの形成方法に関する。

#### 〔従来の技術〕

D ループは、第1図に示すように、互いに共通の塩基配列をもつ二重鎖 DNA と単鎖 DNA とから形成される複合体である。二重鎖 DNA の一方の鎖と単鎖 DNA との間で塩基対を作りヘチロ二重鎖と呼ばれる二重鎖構造を作り、一方相手を失った二重鎖 DNA の他方の鎖がループ状になっている。この D ループは、クローニングした遺伝子の任意の部分に突然変異を導入する技術に用いられている (Shortle et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5375. Green and Tibbetts (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2455)。また、この構造を高い頻度で作ることができれば、遺伝子の構造研究、遺伝子診断などに役立つ特別

な塩基配列をもつDNAを拾い出す技術などが実現できる。端の全く無い、いわゆる閉環状二重鎖DNAで天然に存在する型のは右巻きの(負の)超ラセンを持っている。この負の超ラセンを持つ閉環状二重鎖DNAの上のDループは、通常の二重ラセンと同じ程度の高度の安定性を持つ。遺伝子のクローニングの多くに用いられるプラスミドもその殆どが負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAであり、Dループ形成を利用した技術を考える時、その対象となるDNAは殆どの場合、負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAである。一方、端を持つ二重鎖DNAの上のDループは非常に不安定である。

(発明が解決しようとする問題点)

大腸菌の recA 蛋白や他生物の recA 蛋白類似蛋白は、Dループ生成の反応を、ATP の助けによって10万~100万倍も加速する。即ち、これらの蛋白を利用すると、ごく微量のDNAを用いて、短時間で高い収率でDループを作らせる事ができる。(柴田武彦(1986)。recA 蛋白

によるDNA組換え反応、醸造協会誌81:86)ところが、単離状態では非常に安定な閉環状二重鎖DNA上のDループは、反応液の中では、Dループ形成を行う recA 蛋白そのものの働きによって、形成の後、二重鎖DNAと単鎖DNAとに解離されてしまう。そこで、高い収率で閉環状二重鎖DNAの上にDループを得るには、recA 蛋白の量または、反応の時間を、用いる2種類のDNAの量に応じて厳密に調節しなければならない。この特性は、recA 蛋白によるDループ形成を技術として利用する場合、非常に不利である。

そこで本発明はこのような recA 蛋白様蛋白の持つ特性を改良し、容易にDループを形成する方法を提供することを目的とする。

(問題点を解決するための手段)

本発明は、閉環状二重鎖DNAと該二重鎖DNAと共通の塩基配列を有する単鎖DNA断片とを recA 蛋白様蛋白と抗 recA 蛋白様蛋白単クローン抗体とで処理することからなる閉環状二重鎖DNAにDループ構造を形成する方法に関する。

以下本発明について説明する。

本発明において用いる閉環状二重鎖DNAとしては、既知、未知を問わずいかなる閉環状二重鎖DNAであってもよい。また、単鎖DNA断片は、該二重鎖DNAと共通の塩基配列を有するものであれば、DNAの大きさ等に特に制限はない。

本発明に用いる recA 蛋白様蛋白としては、例えば大腸菌 recA 蛋白並びに類似蛋白であるT4ファージ由来の uvs X 蛋白、枯草菌由来の rec 蛋白及び黒穂菌(Ustilago)由来の rec I 蛋白等を挙げることができる。これらの蛋白は例えば [recA; Shibata et al. (1983) Methods in Enzymology 100:197, uvs X; Yonesaki et al. (1985) Eur. J. Biochem. 148:127, rec 蛋白; Lovett and Roberts (1985) J. Biol. Chem. 260:3305, rec I; Kmiec and Hollman (1982) Cell 29:3677] の記載に基いて単離することができる。

また抗 recA 蛋白様蛋白単クローン抗体の代表例としては、ARM 193 が挙げられ、例えば牧野らの方法 (Makinoら(1985) J. Biol. Chem. 260:

15402) によって入手することができる。

recA 蛋白に対して作った単クローン抗体はそれぞれ、recA 蛋白のもつ多種類の活性に対して様々な異なる挙動を示す (Makinoら (1985) J. Biol. Chem. 260:15402)。その中の一群の単クローン抗体 (たとえば ARM 193) は、recA 蛋白によるDループ形成の反応をあまり阻害しないが、recA 蛋白による閉環状二重鎖DNA上のDループの解離反応を強く阻害する。そこで、recA 蛋白による負の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNAと単鎖DNAとを基質とするDループ形成反応の系に、この抗体 (たとえば ARM 193) を recA 蛋白に対して十分量加えると、Dループの解離を抑え、高い収率でDループを得ることができるようになる。この場合、recA 蛋白の量は単に単鎖DNAに対して十分量で有れば良く(予測されるDNA量に対し余分に加えるだけで良い)、また反応時間も30分もあれば十分であり、抗体を使わない時のような蛋白量、時間の厳密な調節は不要となる。

以下本発明を実施例により説明する。

#### 実施例

##### 1. 材料

- (1) recA 蛋白、 $^3\text{H}$ で標識したファージfd複製中間体(RFI) DNA (食の超ラセンをもつ閉環状二重鎖DNA)、ファージfdのファージ粒子の単鎖DNAの断片；これらは柴田ら(1983)Methods in Enzymology, vol.100, pp. 197の記述にしたがって調製した。
- (2) 抗 recA 蛋白単クローン抗体；ARM 193 をYakino et al. (1985) J. Biol. Chem. 260 :15402の記述にしたがってアフィニティークロマトによって調製して用いた。

##### 2. 反応液

3.1 mM Tris-HC 2 緩衝液 (pH 7.5)、1.3 mM 塩化マグネシウム、1.8 mM グチオスレイトール、8.8  $\mu\text{M}$  牛血清アルブミン、1.3 mM ATP、ATP 再生系 (7.8 mM リン酸クレアチン、リン酸クレアチンキナーゼ)、3.7  $\mu\text{M}$  (ヌクレオチド残基で) [ $^3\text{H}$ ] fd RFI DNA、

0.40  $\mu\text{M}$  (ヌクレオチド残基で) fd 単鎖 DNA 断片、0.50  $\mu\text{M}$  recA 蛋白、0.50  $\mu\text{M}$  ARM 193。反応液の体積は21  $\mu\text{L}$  ~ 0.2 mL。

##### 3. 反応

ATP、塩化マグネシウム、単鎖DNA、二重鎖DNA、ATP 再生系を除いた反応液の中で、recA 蛋白とARM 193とを37度で5分間保温した。次に、塩化マグネシウム、2種類のDNA、ATP 再生系(ATPは無し)を加え、さらに2分間37度で保温した。Dループ形成反応はATPを添加することによって開始した。第2図に示した時間、37度で保温した後、20  $\mu\text{L}$  ずつサンプルとして採取した。採取したサンプルはEDTAとSarkosylとによって処理し、蛋白を除いた後、Dループアッセイ(柴田ら(1983)Methods in Enzymology, vol. 100, pp. 197)によって、できたDループの量を測定した。できたDループの量は、DループとなったRFI DNAの反応系に加えたRFI DNAに対する百分率で表した。第2図にお

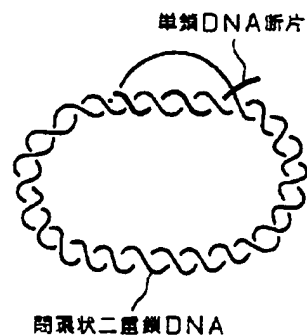
いて●は上記の反応によってできたDループの量を示す。○は抗体(ARM 193)を加えなかった時のDループの量の時間変化を示す。■は上記の反応系のfdのファージ単鎖DNA断片を $\phi$ X174のファージ単鎖DNA断片に置き換えた場合を示す。 $\phi$ X174とfdとは互いに相同な塩基配列は持たないので、Dループはできない。□は $\phi$ X174の単鎖DNA断片を用い、更に、ARM 193を除いた場合を示す。

抗体が無い場合には一度できたDループが反応時間の経過と共に完全に解離されてしまうが、抗体ARM 193が有る場合には、10分で50%の閉環状二重鎖DNAがDループになり、1時間経過してもそのままの量を保っている。

##### 4. 図面の簡単な説明

第1図はDループを形成している閉環状二重鎖DNAを示し、第2図は、実施例の結果であるDループ形成の経時変化を示す。

第1図



第2図

